



北海道公立大学法人
札幌医科大学
Sapporo Medical University

SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY INFORMATION AND KNOWLEDGE REPOSITORY

Title 論文題目	SIRT1 deficiency interferes with membrane resealing after cell membrane injury. (SIRT1 の欠損は細胞膜損傷後の修復を阻害する)
Author(s) 著 者	藤原, 大輔
Degree number 学位記番号	甲第 3069 号
Degree name 学位の種別	博士 (医学)
Issue Date 学位取得年月日	2019-09-30
Original Article 原著論文	PLoS One. 2019 Jun 26;14(6):e0218329. doi: 10.1371/journal.pone.0218329. eCollection 2019. PMID: 31242212
Doc URL	
DOI	
Resource Version	Publisher Version

学位論文の内容の要旨

報 告 番 号	甲第 3069 号	氏 名	藤 原 大 輔
<p>○ 論文題名</p> <p>SIRT1 deficiency interferes with membrane resealing after cell membrane injury (SIRT1 の欠損は細胞膜損傷後の修復を阻害する)</p> <p>○ 研究目的</p> <p>SIRT1 は NAD⁺依存性の蛋白脱アセチル化酵素であり、7 つある sirtuin ファミリーの一つである。これまでの研究では SIRT1 活性化薬である resveratrol の経口投与が <i>Duchenne</i> 型筋ジストロフィーモデル (<i>mdx</i> マウス) の筋肉の線維化と筋の障害を抑制し、筋力と持久力を改善した。SIRT1 は筋細胞の細胞膜下にも存在しており、SIRT1 が細胞膜に何らかの役割を果たしている可能性がある。そこで、筋肉における SIRT1 の生理機能、特に膜修復過程への関与について検討を行った。</p> <p>○ 研究方法</p> <p><u>Skeletal muscle-specific SIRT1 knockout (SIRT1-MKO) マウスの作成</u> : SIRT1-MKO マウスは SIRT1^{flox/flox} マウス (B6;129-Sirt1^{tm1Ygu}) と α-skeletal muscle actin promoter 下に Cre を発現するマウス (ACTA1-Cre^{79Jme/J}) を交配して作成した。</p> <p><u>マウス骨格筋機能の評価</u> : トレッドミル試験、反転ネット試験およびグリップテストにより運動機能を測定した。また、エバンスブルーを腹腔内注射したあと 16 時間後にトレッドミル試験を行い、その 1 時間後に分離した大腿四頭筋の凍結切片により筋障害を評価した。</p> <p><u>CK と LDH 活性の評価</u> : WT と SIRT1-MKO マウスにトレッドミル試験を行い、その前後 (14 日前と 1 時間後) に採血し、筋障害のマーカーとして血清中の creatinine kinase (CK) と lactate dehydrogenase (LDH) を測定した。</p> <p><u>組織の評価</u> : マウス大腿四頭筋をイソペンタン/液体窒素法で凍結後、薄層切片を作成し各種染色、もしくは SIRT1 抗体等を用いた免疫染色を行った。</p> <p><u>細胞膜修復能の評価</u> : マウスの筋芽 C2C12 細胞を用いた。nicotinamide, または Ex527 を 12 時間作用させて SIRT1 活性を阻害した。また、<i>Sirt1</i> をノックダウンには <i>Sirt1-siRNA</i> または <i>control-si RNA</i> を Lipofectamine RNAiMAX を使い導入し、導入 48 時間後に分析した。C2C12 細胞の myofiber への分化は 2%ウマ血清存在下で細胞を培養し、培養 1 週間後に myofiber であることを確認して用いた。</p> <p>細胞膜の傷害と修復は細胞を 10 μ M FM1-43 蛍光色素を加えた Live Cell Imaging</p>			

Solution 存在下におき動画で観察した。Nikon A1 共焦点レーザー顕微鏡の photo-activation mode を用いてレーザー照射により C2C12 細胞膜に $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ の大きさで穴を開けて、その修復過程を細胞内に流入する蛍光色素の輝度の変化で評価した。

○ 研究成績及び考察

SIRT1 は骨格筋細胞の細胞膜直下に多く局在していた。WT マウスの大腿四頭筋では中心核は 0.5% であった。一方、SIRT1-MKO マウスでは中心核は 20% であり、小径繊維の割合が有意に増加し、中間径の筋繊維の割合は逆に減少していた。従って、SIRT1-MKO マウスでは骨格筋の崩壊が起きていることが考えられた。線維化や壊死した筋線維は WT と SIRT1-MKO マウスともにほとんど観察されなかった。また、血管内皮細胞のマーカーである CD31 陽性の血管の数でも有意差は認められなかった。

トレッドミル試験、反転ネット試験およびグリップテストの結果、WT マウスより SIRT1-MKO マウスで運動耐容能と筋力が有意に低かった。また、SIRT1-MKO マウスでは運動後の筋肉へのエバンスブルーの取り込み面積が WT よりも 4 倍多く、筋が傷害されやすいことが判明した。トレッドミル試験後の CK、LDH の値は SIRT1-MKO マウスで有意に高かった。また、運動前の CK 値でも SIRT1-MKO マウスで有意に高く、SIRT1-MKO マウスは軽度の筋ジストロフィーと同様の状態であることが考えられた。

細胞膜修復能の評価では、nicotinamide を投与した群で FM 色素の取り込みが有意に多かった。Control 細胞ではレーザーによる膜損傷後、損傷部直下に vesicles が集積し、癒合し、ドーム状に細胞膜が膨出した。しかし、nicotinamide 投与群では vesicles は集積するが癒合や膜への接着が抑制され、膜は陥凹することが有意に多かった。同様の結果が Ex527 による SIRT1 阻害や *Sirt1-siRNA* 処置群で観察された。C2C12 細胞は myofiber に分化させることができる。そこで、C2C12 細胞由来の myofiber において SIRT1 阻害薬の nicotinamide の作用を観察した。nicotinamide は C2C12 myoblast 細胞と同様に細胞膜の修復過程を阻害することが判明した。

SIRT1 の抑制が膜修復に関与する分子の発現量に影響している可能性について検討した。11 種類の分子の mRNA の発現量について調べたところ、nicotinamide 処置群では ANNA1 が減少し、ASM がやや増加させた。しかし、*Sirt1-siRNA* 処置群では変化が見られなかった。従って、SIRT1 阻害による細胞膜の修復阻害は、SIRT1 が膜修復関連遺伝子の発現を調節するためではないことが判明した。

○ 結論

SIRT1 は傷害された筋細胞膜の修復に必要であり、SIRT1 の発現が抑制されたり、活性が阻害されると細胞膜修復が障害された。SIRT1 の阻害により形態的には vesicles の癒合と損傷部位のドーム状の修復膜形成が抑制されることが判明した。

SIRT1 活性化が筋ジストロフィーに治療効果をもたらす理由の 1 つとして、細胞膜の修復が関与する可能性が示された。

論文審査の要旨及び担当者

令和 1 年 9 月 2 日 提出

(令和 1 年 9 月 30 日授与)

報告番号	甲第 3069 号	氏 名	藤原 大輔
論文審査 担 当 者	主査 教授 堀尾 嘉幸	副査 教授 下濱 俊	
	副査 教授 長峯 隆	委員 教授 山蔭 道明	

論文題名	SIRT1 deficiency interferes with membrane resealing after cell membrane injury (SIRT1 の欠損は細胞膜損傷後の修復を阻害する)
結果の要旨	
SIRT1-MKO マウスは、筋ジストロフィーときわめて類似した組織学的特徴や病態を示し、持久力や筋力の低下、筋障害が生じ、血清 CK 値が上昇していることを見出した。また、運動後の骨格筋傷害が正常マウスに比べて大きいことが認められた。筋芽細胞および筋管細胞で SIRT1 を抑制またはノックダウンすると膜修復が障害されることを見出し、SIRT1 が細胞膜修復に関与することを初めて明らかとした。以上のことから、本研究成果が博士（医学）の学位授与に値するとすべての審査委員が判断した。	